





دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی قزوین

# بررسی آلودگی کلستریدیوم دیفیسیل در گوشت های گاو عرضه شده در شهر قزوین

استاد راهنما:

دکتر رزاق محمودی

استاد مشاور:

دکتر پیمان قجریگی

مشاور آماری:

آقای سعید شمسواری

دانشجو:

سمانه حسنی

دانشجوی ارشد بهداشت و ایمنی مواد غذایی

دی ماه

سال ۱۳۹۹

## بیان مسئله و مقدمه

کلستریدیوم ها:

مانند: کلستریدیوم بوتولینوم، کلستریدیوم پرفرنجنس که شناخته شده تر هستند.

گرم	اسپور	تحرک
مثبت	اسپورزا	متحرک

کلستریدیوم دیفیسیل یک گونه بیماریزا و نسبتا جدیدتر از این باکتری میباشد .



## بیان مسئله و مقدمه

- کلستریدیوم دیفیسیل به عنوان یکی از عوامل اصلی ایجاد میلیون ها بیماری عفونی منجر به مرگ در جهان شناخته شده است. آلودگی با این باکتری در سراسر جهان در حال افزایش است.
- طیف گسترده عفونت، از یک اسهال ملایم تا کولیت با غشاء کاذب می باشد که منجر به وخامت بیماری و افزایش خطر مرگ در بیماران بستری در بیمارستان ها بویژه در بیماران مسن می شود.



## اهمیت گوشت

✓ گوشت یک ماده مغذی و ضروری برای بدن انسان و منبع غنی از پروتئین و املاح معدنی می باشد.

✓ در هرم غذایی میزان مصرف مجاز گوشت برای افراد بالغ و سالم حداکثر دو واحد معادل ۱۲۰ گرم است که از گوشت قرمز بدون چربی، مرغ و ماهی تشکیل شده است.

✓ سالانه ۸۲۰ هزار تن گوشت قرمز در کشور تولید می شود. سرانه مصرف گوشت قرمز در ایران بر اساس جدیدترین آمار، ۱۱ تا ۱۱/۵ کیلو گرم اعلام شده است.







## بیان مسئله و مقدمه

✓ حضور این باکتری در گوشت های حیوانی عرضه شده در بازار (گاو، گوسفند، خوک) گزارش شده است (Hoffer;2010). اما از میزان شیوع آن در ایران اطلاعات چندانی در دست نیست.

انتقال کلستریدیوم دیفیسیل از مسیر دهانی - مدفوعی و با خوردن اسپور باکتری آغاز می شود. اسپورها می توانند در محیط های هوایی باقی بمانند، در PH پایین معده دوام یابند و منجر به انتقال بیماری شوند.

✓ اسپور حاصل از باکتری تا مدت های طولانی در گوشت زنده می ماند و توانایی عبور از محیط اسیدی معده را دارد (goodarzi,H2012).



## جمع بندی و نتیجه گیری بیان مسئله

نظر به اینکه مصرف گوشت گاو یکی از مسیرهای انتقال  
اسپور کلستریدیوم دیفیسیل محسوب می شود و همچنین  
اطلاعات زیادی مبنی بر میزان شیوع این باکتری در  
**ایران** در دست نیست، میزان آلودگی باکتری  
کلستریدیوم دیفیسیل در گوشت های گاو شهر قزوین  
در این مطالعه بررسی شد.



## اهداف پژوهش

**هدف کلی:**

**بررسی آلودگی کلستریدیوم دیفیسیل در گوشت های عرضه شده در شهر قزوین**





## اهداف پژوهش

### اهداف اختصاصی:

۱. تعیین آلودگی کلستریدیوم دیفیسیل در **گوشت گاو** عرضه شده در شهر قزوین با روش کشت و

PCR

۲. تعیین آلودگی کلستریدیوم دیفیسیل در گوشت **چرخ کرده گاو** عرضه شده در شهر قزوین با

روش کشت و PCR

۳. مقایسه آلودگی کلستریدیوم دیفیسیل بین نمونه های **گوشت گاو و گوشت چرخ کرده گاو** عرضه شده در شهر قزوین

۴. مقایسه آلودگی کلستریدیوم دیفیسیل در در نمونه های گوشت گاوو گوشت چرخ کرده ، عرضه شده **بین مناطق مختلف** شهر قزوین



## سوالات پژوهشی

۱- آیا آلودگی کلستریدیوم دیفیسیل در نمونه های **گوشت گاو** عرضه شده در شهر قزوین وجود دارد؟

۲- آیا آلودگی کلستریدیوم دیفیسیل در نمونه های **گوشت چرخ کرده گاو** عرضه شده در شهر قزوین وجود دارد؟

۳- آیا آلودگی کلستریدیوم دیفیسیل در نمونه های **گوشت گاو و گوشت چرخ کرده گاو** عرضه شده در شهر قزوین متفاوت است؟

۴. آیا میزان آلودگی کلستریدیوم دیفیسیل در نمونه های گوشت گاو و گوشت چرخ کرده، **بین مناطق مختلف شهر قزوین** متفاوت است؟



مقدمه

سابقه تحقیق

مواد و روش ها

نتایج و بحث

نتیجه گیری

پیشنهادهات



## مروری بر مطالعات و متون گذشته

محققین	سال	یافته ها
رحیمی و همکاران	۱۳۹۳	طی مطالعه ای با عنوان «شیوع کلستریدیوم دیفیسیل در گوشت گاو، گوسفند، بز، شتر و بوفالو در ایران» بیان داشتند: بوفالو با 9% بالاترین و گوسفند با 0.9% پایین ترین درصد را دارا بودند.
اسفندیاری و همکاران	۱۳۹۴	در پژوهشی با عنوان «شیوع و توصیف کلستریدیوم دیفیسیل در نمونه های گوشت گاو و گوشت شتر در شهر اصفهان ایران با روش PCR» بیان داشتند از بین ۲۰۰ نمونه گوشت میزان شیوع کلستریدیوم دیفیسیل ۴٪ بود که ۲.۸٪ آن مربوط به گوشت گاو چرخی و ۲.۱٪ گوشت تکه ای گاو بود.
دوستی و همکاران	۱۳۹۴	در مقاله ای با عنوان «بررسی فراوانی ژن tcdA در نمونه های گوشت شمال غرب ایران» بیان داشتند که از تعداد 90 نمونه (60%) دارای کلستریدیوم دیفیسیل بوده که از این تعداد، 8 نمونه دارای ژن tcdA بودند.



## مروری بر مطالعات و متون گذشته

محققین سال یافته ها

**Esfandiari و همکاران** ۲۰۱۶ در پژوهش خود با عنوان «بررسی آلودگی گوشت گوساله عرضه شده به کلستریدیوم دیفیسیل» دریافتند مصرف گوشت گوساله به عنوان یک مخزن احتمالی از کلستریدیوم دیفیسیل در انتقال این باکتری به انسان می تواند عمل کند.

**Rodriguez-Palaci و همکاران** ۲۰۱۴ در مطالعه ای با عنوان «شیوع کلستریدیوم دیفیسیل در کانادا» به بررسی فراوانی کلستریدیوم دیفیسیل در گوساله ها در کانادا پرداختند و درصد فراوانی این باکتری را ۱۱٪ گزارش نمودند؛

**Marvah BakRI** ۲۰۰۶ پژوهشی با عنوان "شیوع کلستریدیوم دیفیسیل در گوشت گاو، گوسفند و بز در جازان عربستان سعودی" بیان کرد از بین ۶۰۰ نمونه گوشت مورد بررسی ۱۰۵٪ نمونه ها آلوده به کلستریدیوم دیفیسیل بودند که این درصد شامل هفت نمونه مثبت (۱۰۱٪) در گوشت گاو بود.

## مواد و روش کار

- ✓ نوع مطالعه: توصیفی تحلیلی مقطعی
- ✓ جامعه پژوهش: گوشت گاو و گوشت چرخ کرده گاو
- ✓ مکان پژوهش: مراکز عرضه گوشت گاو در مناطق سه گانه شهر قزوین
- ✓ روش نمونه گیری: تصادفی
- ✓ فرمول نمونه گیری:
- ✓ با توجه به تحقیقات انجام شده در زمینه های مشابه، با در نظر گرفتن شیوع ۴ درصد، حجم نمونه به تعداد ۵۰ عدد بود که برای **افزایش دقت نمونه گیری و کاهش درصد خطا**، تعداد ۶۰ نمونه (هر منطقه ۲۰ نمونه) تعیین شد.

✓

$$n = \frac{(Z_{1-\frac{\alpha}{2}})^2 \times p(1-p)^2}{d^2}$$

## مراحل پژوهش (کشت میکروبی)

۱. نمونه برداری (طبق استاندارد ۶۹۰ نمونه برداری از گوشت)
۲. انتقال به آزمایشگاه کنترل کیفیت (دامپزشکی استان قزوین)
۳. هموژن کردن با استومیکر
۴. غنی سازی در محیط CDMN براث
۵. شوک الکلی
۶. سانتریفیوژ
۷. کشت در محیط CDMN آگار (به اضافه ۷ درصد خون گوسفند)
۸. کشت در بلاد آگار
۹. تایید کلنی ها با آزمایشات بیوشیمیایی



## مراحل پژوهش (بخش مولکولی)

- ۱ • استخراج DNA به روش بویلینگ
- ۲ • آزمایش کمی DNA (نانو دراپ)
- ۳ • آزمایش کیفی DNA (الکتروفورز)
- ۴ • طراحی و سفارش پرایمر
- ۵ • ترموسایکلر (PCR)
- ۶ • Real-Time PCR



## استخراج DNA به روش بویلینگ



## ارزیابی کمی و کیفی DNA

ارزیابی کیفیت DNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (نانو دراپ):  
2 میکرو لیتر از محلول DNA را به صفحه چشمی مخصوص تزریق کردیم.  
عدد طول موج بر حسب نانومتر توسط دستگاه اندازه گیری شد.  
عدد به دست آمده نشانگر کیفیت قابل قبول DNA بود.

## طراحی پرایمر

با اخذ توالی ژن ها از سایت nbcی با کمک نرم افزار Primer Exper انجام پذیرفت.

ژن	توالی نوکلئوتیدی	اندازه
tcd	F-GGCTGAAGCTAATGCAGATAATG R- CCTCTCTCTGAACTTCTTGCTAAT	Pb 421

برای انجام PCR از دستگاه ترموسایکلر مدل ABI با سیکل دمایی طبق جدول، در ۳۵ سیکل

انجام شد.





## جدول زمان بندی دستگاه

Gene	Initial denaturation	denaturation	Annealing	Extension	Final extension
tcd	95/15 min	95/20 sec	30/60 Sec	72/20 min	72/ 7 min

آنالیز محصول PCR بر روی ژل آگاروز ۱٪ و بافر TBE انجام شد و در نهایت باندهای اختصاصی با دستگاه Transluminator مورد ارزیابی قرار گرفت.

## Real-Time PCR

مواد لازم و مقدار آن:

Reaction	Master Mix	ddH <sub>2</sub> O	Template	Primer F	Primer R	Total
Size	5	3	2	0/5	0/5	10

نمایی از دستگاه Real-Time PCR





## آنالیز آماری

روش های اندازه گیری و سنجش متغیرهای پژوهش :

تحلیل نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS ورژن ۲۵ انجام گرفت.

جهت مقایسه میزان آلودگی بین اشکال مختلف گوشت همچنین جهت مقایسه شیوع باکتری در مناطق مختلف شهر قزوین از آزمون آماری کای اسکور استفاده شد.



## ملاحظات اخلاقی

- ✓ اطلاعات فروشندگان در تمام مدت مطالعه محرمانه خواهد ماند.
- ✓ اجازه آگاهانه از افراد یا مکانهایی که در این مطالعه شرکت داشته اند گرفته خواهد شد.

## محدودیت ها:

- ✓ تامین امکانات مالی مورد نیاز برای افزایش تعداد نمونه ها و آنالیز با دستگاه PCR
- ✓ محدودیت زمانی



## یافته ها

### درصد آلودگی انواع گوشت به تفکیک مناطق شهر قزوین

گوشت چرخ کرده			گوشت تکه ای		
شمال	مرکز	جنوب	شمال	مرکز	جنوب
۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰
تعداد نمونه					
۰	۱	۱	۰	۱	۱
موارد آلوده					
۳/۳۳ درصد			۱/۷ درصد		
مجموع			مجموع		
درصد آلودگی			درصد آلودگی		

## یافته ها



با توجه به آزمون کای اسکور درصد شیوع باکتری کلستریدیوم دیفیسیل به صورت معنی داری ( $P \leq 0/01$ ) در گوشت چرخ کرده بیشتر بود.



## یافته ها

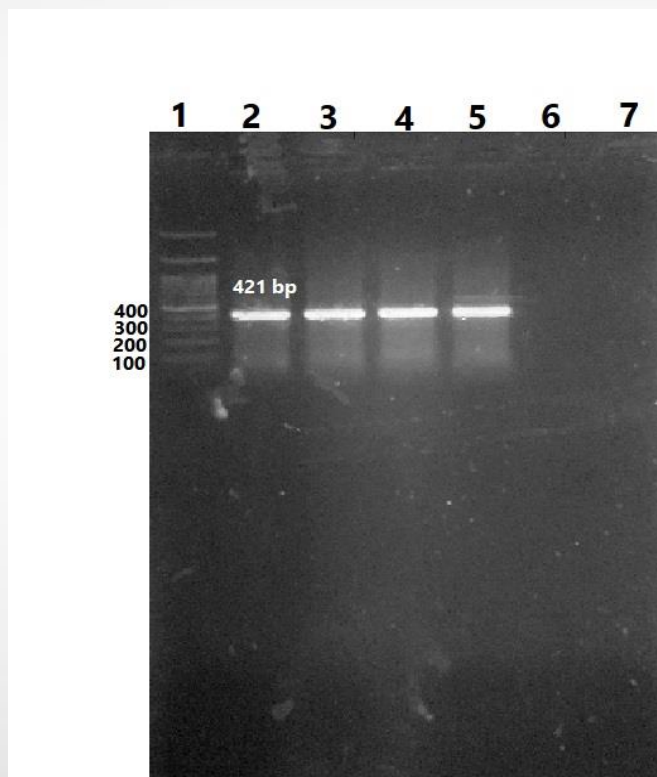
از هر منطقه ۴۰ عدد به صورت تصادفی نمونه برداری شد. طبق نتایج به دست آمده منطقه جنوب شهر با ۲ مورد نمونه مثبت (۵ درصد) بیشترین و شمال شهر با ۰ نمونه مثبت کمترین میزان آلودگی گزارش شد



با توجه به آزمون کای اسکور درصد شیوع کلستریدیوم دیفیسیل به صورت معنی داری ( $P \leq 0/01$ ) در نمونه های گوشت خام جمع آوری شده از جنوب شهر قزوین بیشتر مشاهده شد.

## یافته ها

### تصویر الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره ای پلیمراز

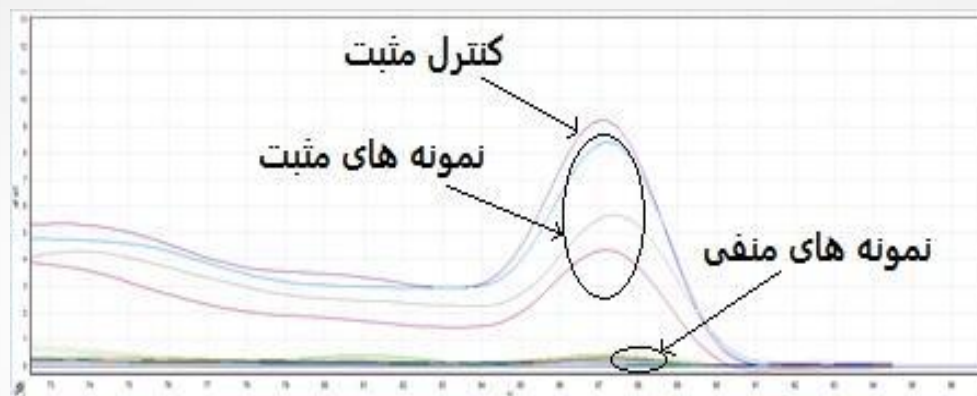


1: مارکر Ladder  
2: نمونه کنترل  
مثبت کلستریدیوم  
دیفیسیل  
3.4.5: نمونه های  
مثبت  
6.7: نمونه های  
منفی



## نتایج RT-PCR

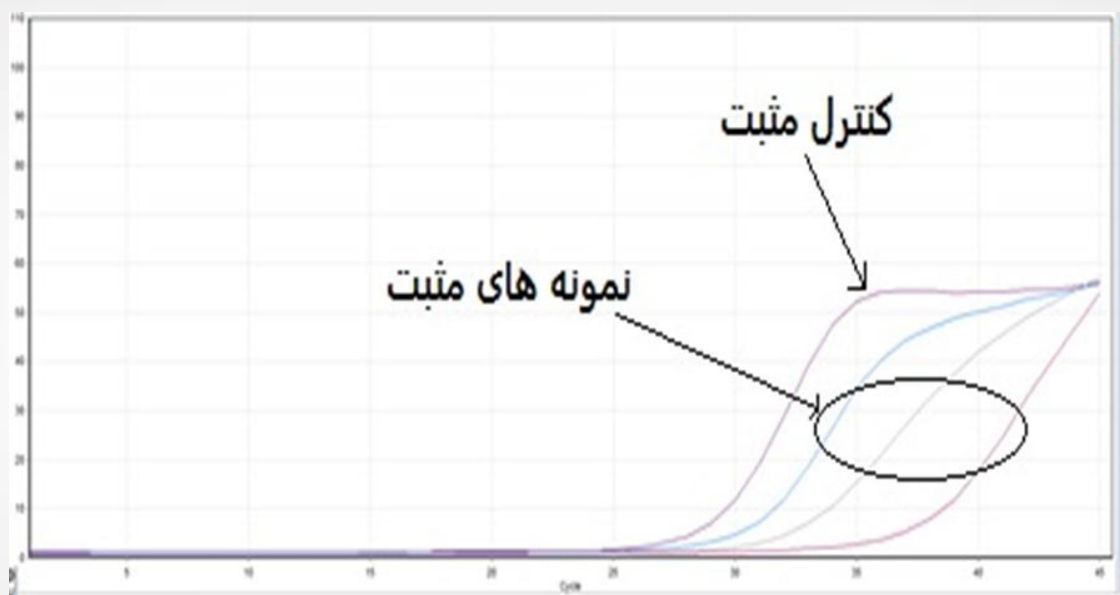
### منحنی ذوب



منحنی ذوب. یکی بودن نقطه ذوب نمونه کنترل مثبت و نمونه های مثبت نشان دهنده آن است که همه نمونه ها ژن مورد نظر (tcd) را دارا می باشند.

## نتایج شمارش با RT-PCR

نمودار جذب فلورسنس



افزایش جذب میزان فلورسنس نشانگر تکثیر محصول PCR در واکنش می باشد



## نتایج و بحث

محقق	سال	نوع پژوهش	یافته ها	هم سو	نتیجه
بوتیر	۲۰۱۰ فرانسه	شناسایی و ردیابی C.Difficile در ۱۰۵ نمونه گوشت چرخ کرده (تحت بسته بندی خلا یا غیر خلا)	۲ نمونه (۱/۹ درصد) با شرایط بسته بندی تحت خلا آلوده به باکتری C.Difficile گزارش گردید	بله	در این بررسی جداسازی باکتری از بسته بندی تحت خلا به دلیل ماهیت بی هوازی بودن این باکتری عنوان شد. در این بررسی به میزان شیوع پایین C.Difficile در فروشگاه های فرانسه به دلیل اجرای سیستم HACCP و رعایت معیارهای کنترل میکروبی اشاره شد.
برندی	۲۰۱۲ امریکا	بررسی C.Difficile در ۶۵ نمونه گوشت چرخ کرده خام و ۲۳ مورد غذای آماده به مصرف	در ۳۷ نمونه از مجموع ۸۸ نمونه مورد بررسی با فراوانی ۴۲ درصد C.Difficile جداسازی گردید	بله	امکان حضور آلودگی در محصولات آماده به مصرف نیز وجود دارد و در این تحقیق میزان آن ۸ درصد بیشتر از محصولات خام بود بنابراین لزوم بررسی های بیشتر بر روی این محصولات ضروری به نظر می رسد.

## بحث

محقق	سال	نوع پژوهش	یافته ها	هم سو بودن	نتیجه
زهرا اسفندیاری	۲۰۱۲ ایران	بررسی شیوع C.Difficile در گوشت تکه ای و چرخ کرده گاو	۱۲ نمونه مثبت یافت شد که ۲ تای آن گوشت تکه ای و ۱۰ تای آن چرخ کرده بود	بله	C.Difficile در گوشت های چرخ کرده گوساله نسبت به شکل تکه ای افزایش داشت که می تواند به علت عدم رعایت اصول بهداشتی در شست و شو باشد
ابراهیم رحیمی	۲۰۱۴ ایران	ردیابی C.Difficile در گوشت های گاو گوسفند بز شتر بوفالو	۲ نمونه مثبت در گوشت گوساله و ۱ نمونه در گوشت گاو	بله	نتایج این مطالعه نشان داد که مصرف گوشت گوساله به عنوان منبعی از C.Difficile در انتقال این باکتری به انسان می تواند عمل کند

## نتایج و بحث

محقق	سال	نوع پژوهش	یافته ها	همسو بودن	نتیجه گیری
رودریگوز پالاسی	۲۰۱۴ کانادا	ردیابی مولکولی باکتری C.Difficile از ۲۱۴ فروشگاه گوشت	۱۳ ایزوله مثبت که ۳ تای آن مربوط به گوشت تکه ای و ۱۰ تای آن برای چرخ کرده بود	بله	نتایج این بررسی حاکی از تنوع گسترده کلستریدیوم دیفیسیل در گوشت توزیع شده در فروشگاه های کانادا بود.
مروه بکری	۲۰۱۵ عربستان	بررسی شیوع و جداسازی کلستریدیوم دیفیسیل در ۶۰۰ نمونه گوشت گاو	۷ نمونه مثبت در گوشت گاو یافت شد	بله	این مطالعه خطر بالقوه گوشت خام در انتقال این باکتری را نشان داد



## نتایج و بحث

محقق	سال	نوع پژوهش	یافته ها	هم سو	نتیجه
رناتا پیرز	۲۰۱۷ برزیل	شناسایی و ردیابی C.Difficile در ۸۰ نمونه گوشت گاو گوسفند خوک	هیچ نمونه ی آلوده ای به باکتری C.Difficile یافت نشد	-	نتایج نشان دهنده سطح بالای بهداشت و عدم آلودگی ثانویه می باشد
فاطمه اتاسوی	۲۰۱۷ ترکیه	بررسی ۱۰۰ نمونه گوشت گاو شامل ۵۰ نمونه گوشت تکه ای و باز و ۵۰ نمونه گوشت چرخ کرده و در بسته بندی MAP	۲نمونه گوشت چرخ کرده و ۱نمونه گوشت تکه ای آلوده یافت شد	بله	نتیجه این مطالعه نشان داد که سویه های C.Difficile که در نمونه های گوشت گاو بسته بندی شده با اتمسفر اصلاح شده (MAP) شناسایی شده اند می توانند یک مشکل بالقوه برای سلامت جامعه باشند.



## نتیجه گیری

- میزان شیوع کلستریدیوم دیفیسیل در گوشت به شکل **چرخ کرده** بیشتر از تکه‌ای بود این تفاوت شاید به دلیل امکان اتصال اسپور های کلستریدیوم دیفیسیل به بیوفیلم تشکیل شده در دستگاه چرخ گوشت و عدم شستشوی مناسب دستگاه باشد.
- در حال حاضر کلستریدیوم دیفیسیل به عنوان یک پاتوژن غذا زاد معرفی نشده است اما **بر اساس ایمنی مواد غذایی** جلوگیری از ورود اسپور این باکتری توکسیژنیک در مواد غذایی و در نتیجه کاهش مواجهه مصرف کنندگان ضرورت می یابد.



## نتیجه گیری کلی

- نظر به اینکه کلستریدیوم دیفیسیل در دمای پخت معادل ۷۱ درجه سلسیوس به مدت ۲ ساعت در گوشت چرخ کرده قابلیت بقا دارد و با حرارت دهی مجدد محصول پس از این دما در ۸۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه حدوداً ۹۰ درصد از اسپور باکتری نابود می شود لذا:
- آگاهی بخشی به افراد در بخش عرضه گوشت در خصوص رعایت کامل مسایل بهداشتی و نظافت و شستشوی منظم چرخ گوشت و همچنین آگاهی بخشی به مصرف کنندگان در جهت پخت صحیح و حرارت دهی کافی به محصولات و فراورده های گوشتی ضروری بنظر می رسد.



## پیشهادات

### پیشنهادهای پژوهشی

۱-انجام طرح های مشابه برای شناسایی سایر باکتری ها مانند کلستریدیوم

پرفرنجنس در گوشت های چرخ کرده استان قزوین

۲-بررسی **الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی** باکتری کلستریدیوم دیفیسیل

۳-بررسی شیوع باکتری بر روی سایر فرآورده های گوشتی



## پیشهادات

### پیشنهادهای اجرایی

۱- آلودگی مواد غذایی به کلستریدیوم دیفیسیل می تواند به دنبال **آلودگی ثانویه** مواد غذایی در جریان ضبح دام یا توزیع گوشت اتفاق بیفتد. از آنجایی که انتقال باکتری از طریق پشم، پوست، محتویات شکمی دام به گوشت ویا ابزار و وسایل آلوده محتمل است بنابراین مکانیزه شدن کشتارگاه ها ضروری بنظر می رسد.

۲- رعایت اصول HACCP از مراکز تولید گرفته تا مراکز عرضه قطعا می تواند نقش بسزایی در کاهش آلودگی محصولات و فرآورده های گوشتی ایفا نماید.



## رفرنس

1. A. Najafi a MZDb, H. Karimianb, A. Abediniac, Nejadd MH. Microbiological Changes of Pousti Cheese During Ripening. Food Technology & Nutrition. 2011;8(2)
2. Rezaei m, Yahyaei m, Parviz m, Khodaei motlagh m. A survey of microbial contamination in traditional cheese distributed in Markazi province in 2010. Iranian Journal of Health and Environment. 2014;7(1):115-22
3. Gholami M, Zargar m, Aghaee s. Identification of Listeria monocytogenes from raw milk by cell culture and PCR methods of the actA gene. Journal of Applied Biology. 2016;7(1):39-47
4. Abdimoghadam Z, Mortazavian A, Shamloo E, Atefi M. Frequency of Listeria species in raw milk and traditional dairy products in Isfahan, Iran. Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology. 2015;10(3):101-7



مقدمه

مروری بر منابع

مواد و روش ها

نتایج و بحث

نتیجه گیری

پیشنهادهات


## تشکر و قدردانی..

مراتب سپاس و قدردانی خویش را از سر صدق و اخلاص به محضر استاد گرانقدر آقای دکتر محمودی که در نهایت سعه صدر و خالصانه همواره با حمایت ها و رهنمودهای ارزشمند و سازنده، اینجانب را در انجام این پایان نامه مورد محبت خویش قرار داده اند، ابراز می دارم.

همچنین از حمایت های ارزنده استاد ارجمند آقای دکتر قجریگی که در کلیه مراحل تحقیق با راهنمایی و مشاوره های اندیشمندانه خود برای تکمیل و ارتقاء کیفیت این رساله کمک موثری داشته اند، نهایت تشکر و قدردانی را به جای آورم.

از خانواده عزیز و گرامی ام که در طول تحصیل همواره سنگ صبور و حامی من بودند و سعی کردند که من دغدغه ای به جز کسب علم و دانش نداشته باشم ممنون و سپاسگزارم و از خداوند بزرگ سلامتی، پیشرفت و بهروزی برایشان آرزومندم.

همچنین از آقای دکتر پاک بین بابت زحماتی که برای پایان نامه من کشیدند کمال تشکر را دارم.

A decorative header featuring several white and light gray diamond shapes of varying sizes, some with colored borders (purple, teal, dark green), arranged in a cluster at the top of the slide against a dark teal background.

با سپاس فراوان از تمامی  
عزیزان حاضر در جلسه

